柑橘潰瘍病及其病原菌

吳文川[1]　鄭安秀[2]　王玉如[2]　胡建國[3]
國立中興大學植物病理學研究所教授[1]、研究生[2]及研究助理[3]

摘　要

柑橘潰瘍病，分佈廣泛，是國際柑橘栽培上最具破壞性的一種細菌性病害，由 *Xanthomonas campestris* pv. *citri* 所引起。*X. campestris* pv. *citri* 是一種具有一條極生鞭毛的短桿狀細菌，含有不同大小的質體及一、二種的轉位子。柑橘潰瘍病菌A病原型菌株的病原性基因，經接合交配至 *X. campestris* pv. *citri* 的E病原型菌株、*X. campestris* pv. *alfalfae* 及 *X. campestris* pv. *cyamopsidis* 等細菌，使其在葡萄柚葉片上能誘導產出類似潰瘍病的病斑。柑橘潰瘍病菌的CP1和CP122噬菌體爲球形頭部，帶有一條長尾巴，而CP2和CP115爲多邊球型，具有一條短尾。Cf和Cf16爲絲狀噬菌體，皆含有環狀單股DNA。Cf DNA可利用電孔法成功地經轉染而進入柑橘潰瘍病菌。Cf16侵入 X. *campestris* pv. *citri* 後，其DNA先複製大量複製型（RF）DNA，其中一組RF DNA插入寄主染色體，其他RF DNA仍可和染色體同時存在並自行複製，細胞不斷進行分裂時，RF DNA會由細胞中逐漸丟失，最後僅剩有插入於寄主染色體中的RF DNA狀態噬菌體基因體，此種潛溶過程不同於其他潛溶現象，故稱爲新潛溶過程（Neolysogenization）。柑橘潰瘍病菌XW47菌株，被Cf16 潛溶後分別誘導半胱氨酸及組氨酸合成的突變，而且從柑橘潰瘍病菌所分離的Cf29、Cf32、Cf99、Cf117、Cf134等另一群絲狀噬菌體，也可引起寄主細菌的營養缺陷突變，也可轉導細菌鞭毛的運動性。依病原性之差異，*X. campestris* pv. *citri* 可分五個病原型；A病原型，分佈於世界各地，對葡萄柚、甜橙、檸檬、墨西哥萊姆危害最強；B病原型，分佈於阿根廷、巴拉圭、烏拉圭，對檸檬、墨西哥萊姆具強病原性；C病原型分佈於巴西，僅對墨西哥萊姆有病原性；D病原型分佈於墨西哥，僅感染墨西哥萊姆的葉片；上述四病原型皆可使植株產生凸起、木栓化、外圍具有黃暈的病斑；E病原型僅發生於美國佛羅里達州柑橘苗圃，主要危害枳殼和葡萄柚的Swingle Citrumelo雜交種，可使植株產生扁平、水浸狀的病斑，因其病斑形態不同於前者，少數學者稱此病原型所引起的柑橘病害爲細菌性斑點病，而其病原菌爲 *X. campestris* pv. *citrumelo*。二病害雖有病理學及生化、DNA同源性的差異，目前多數學者仍稱此五病原型所引起的柑橘病害爲潰瘍病，而其病原菌爲 *X.campestris* pv. *citri*。柑橘潰瘍病菌的鑑定或偵測，有接種、生理生化特性、噬菌體、酵素連結抗體法、聚合碳酸膜固定免疫螢光法及單元抗體等測試法；隨著分子生物技術的精進，利用基因體指紋分析、DNA－DNA雜合及RFLP分析更可準確地鑑定或區別柑橘潰瘍病菌各病原型。柑橘潰瘍病菌細胞內含有質體，以其限制酶片段做成的核酸探針，並配合PCR技術，可偵測到25pg純化的DNA或10^3cells／ml濃度的病菌。

關鍵詞： 柑橘潰瘍病、柑橘潰瘍病菌、噬菌體、質體、轉位子。

緒　　言

柑橘潰瘍病於1911年最初被報導發生於美國[37,38]。Facett 和 Jenkins[16] 於1933 年曾報導，保存於英國和美國分別採集於1827～1831年印度西北部的枸櫞（*Citrus medica*）及1842～1844年印尼爪哇的萊姆（*C. aurantifolia*）葉片枝條上有潰瘍病的病斑，此爲世界上有柑橘潰瘍病發生的最早記錄。Lee[42] 於1918年報導，在中國南部的豆金柑（*Fortunella hindsii*）上有潰瘍病的發生。川上[36] 報導，日本福岡於1899年在臍橙上則有此病的發生。柑橘潰瘍病，目前蔓延甚廣，係由一種黃色、格蘭氏陰性的 *Xanthomonas campestris* pv. citri 細菌所引起，危害柑橘葉片、枝條及果實。病害嚴重時，葉片大量脫落，使樹勢衰弱，罹病果實使其市場價格降低，造成經濟上很大的損失[14,37,38]。因此，潰瘍病是目前國際上柑橘栽培國家中最重要而具破壞性的一種細菌病害。柑橘潰瘍病在台灣所栽植的葡萄柚、甜橙、檸檬上普遍發生，而且分佈甚廣，爲害嚴重，形成台灣近年來柑橘栽培管理上一種重要的病害。吳多年從事於柑橘潰瘍病及其病原菌和噬菌體的研究，爲協助有關人士對此問題的認識，進而能降低由此病害所引起的損失，整理所搜集的有關資料，就其病徵、分佈、感病品種、經濟重要性、病原菌、病害環、以及防治對策等曾介紹於上次1987年的研討會[73]。最近，由於所謂柑橘細菌性斑點病之興起，而有其和柑橘潰瘍病間的區別及此二病害各種鑑定和偵測技術等出現，而柑橘潰瘍病菌的質體、轉因子及多種噬菌體陸續被發現；因此，筆者等將此等問題介紹於本次研討會。

柑橘潰瘍病的病徵、發生分佈與防治

病徵

柑橘的葉片、果實、枝條上皆有潰瘍病的發生。在葉片上，首先出現水浸狀暗綠色細點，隨著病勢的進展，病斑逐漸擴大，中央部呈灰白色凹陷，周圍褐色木栓化，表皮破裂而粗糙堅硬；病斑形狀，初期雖爲圓形，老舊病斑則頗不規則，常有多數病斑結連成不規則形的大疤，同一病斑於葉片上下表面均可見到，在病斑邊緣常有黃色暈環。病斑大小視寄主種類而定，葡萄柚上爲最大，其直徑可達8毫米，甜橙類上次之，檸檬上又次之。葡萄 柚、檸檬、甜橙類等枝條上常出現病斑，和葉片上者甚相似，唯其邊緣缺乏黃暈。果實上的病斑也常缺乏鮮明的黃暈，又其病斑表面木栓化更甚，外觀也更粗糙[37,38]。

發生分佈

柑橘潰瘍病廣泛地分佈於日本、韓國、中國、菲律賓、巴布亞新幾內亞、關島、馬里亞納群島、加羅林群島、印尼、越南、高棉、泰國、馬來西亞、新加坡、緬甸、孟加拉、印度、斯里蘭卡、巴基斯坦、尼伯爾、阿富汗、剛果、塞席爾群島、葛摩斯島、馬達加斯加、重聚群島、美國、墨西哥、巴西、烏拉圭、巴拉圭、阿根廷[40]、葉門[29]、沙烏地阿拉伯[64]等國家或地區。

柑橘潰瘍病在台灣，首先由 Okabe[49] 於1932年報導，目前其分佈甚廣，在台北、新竹、苗栗、台中、南投、彰化、雲林、嘉義、台南、高雄、屏東、宜蘭、花蓮、台東等地區所栽植的葡萄柚、甜橙，包括柳橙、晚生橙、臍橙、血橙、雪柑、其他等，南庄橙、檸檬、粗皮檸檬、廣東檸檬、溫州蜜柑、酸橙、扁橘、佛手柑、美女柑、萊姆、柚子、文旦、桶柑、椪柑、

幸福、虎頭柑、枳柚、枳橙、枳殼等皆有發生。葡萄柚主要種植於新竹、嘉義、花蓮、台東等地區，近20年來，所觀察到的葡萄柚園幾乎都發生嚴重的潰瘍病；1986、1987年11月在台東池上台灣土地銀行農場所見到的葡萄柚樹，其果實罹病率分別高達31% 及45%。柳橙普遍栽植於台灣各地，發病也相當嚴重；1986年11月在台南東山一處柳橙園所觀察到的柳橙樹都有潰瘍病發生，其果實罹病率也高達24%。檸檬主要種植於高雄、屏東地區，雖尚未有詳細調查資料，但也普遍有此病發生。根據1986年11月間於嘉義農業試驗分所17種柑橘類所調查的結果，除約30年生晚白柚未見有潰瘍病外，其餘約10年生柑橘類皆有此病發生；葉片罹病率高達30～35%者有臍橙、萊姆，20%左右者有枳橙、檸檬、葡萄柚、南庄橙、幸福、酸橙，10%左右者有虎頭柑、粗皮檸檬、廣東檸檬、晚生橙、柳橙、血橙、麻豆文旦，而5%左右者僅椪柑而已；果實罹病率高達100%者有枳橙，70% 左右者有晚生橙、柳橙、臍橙，30% 左右者有虎頭柑、檸檬、葡萄柚、幸福，20%左右者有萊姆，椪柑僅有1.6% ，而無發病者有酸橙、廣東檸檬、南庄橙、血橙、粗皮檸檬、麻豆文旦等[87]。

就所栽植的經濟柑橘類而言，葡萄柚及甜橙爲最感病品種，檸檬次之，桶柑和柚子、文旦類爲較抗性，椪柑則爲強抗性。一般說起來，椪柑在幼苗時期常有潰瘍病的發生，而成長樹則很少見發病；過去近20年來，僅於高雄旗山夾種於潰瘍病發生嚴重的柳橙園內，於苗栗卓蘭因雜植數棵有嚴重潰瘍病發生的檸檬的椪柑園內，以及於台灣省農業試驗所嘉義分所柑橘園內，見到有潰瘍病的發生[87]。

防治

柑橘潰瘍病的防治，除種植無病幼苗、剪除發病枝條、育成健康柑橘樹、清除雜草、防治潛葉蛾等措施[71,73]之外，可施用銅鋅錳乃浦（久保丹）500倍稀釋液，以達其防治效果[79]。在溫室內所種植的葡萄柚葉片上，CP115噬菌體，單獨、或分別和甲基多保淨（Topsin －M 70% WP）、快得寧（Quinolate 35.5% WP）農藥混合使用24或48小時後接種柑橘潰瘍病菌，能顯著降低潰瘍病的發生，且病斑大小比對照組小[76]。

柑橘潰瘍病菌

病原菌

柑橘潰瘍病的病原菌，最初由Hasse[32]於1915年定名爲*Pseudomonas citri*；後來，由於命名法的改變，其屬名由Pseudomonas於1916年更改爲Bacterium，1920年爲*Bacillus*，1923年爲*Phytomonas*，1939年爲*Xanthomonas*[33]；根據國際植物病理學會所提出的植物病原細菌之命名、分類法、學名認可表[20]，係*Xanthomonas campestris*的Pathovars之一，所以，柑橘潰瘍病菌的學名，於1980年改稱爲*X. campestris* pv. *citri*。它是具有一條極生鞭毛的一種短桿狀細菌，大小爲0.5～0.7 x 1.1～2.0um，常單一存在或呈短鏈狀，在培養基平板上均能形成圓形、中高、邊緣完整、表面光滑、具粘性的黃色菌落，皆爲好氣性，其生長最高溫度爲38 ℃，最低溫度爲10 ℃， 最適溫度爲25 ～30 ℃，皆具有潛溶性，可釋放溫和噬菌體[88]。柑橘潰瘍病菌在病斑內所產生的類似細菌素物質，能抑制菜豆立枯病菌及十字花科、瓜類猝倒病等胞子的發芽，對十字花科蔬菜黑腐病菌也顯示有活性[44]。從柑橘潰瘍病病斑分離出的一種*Pseudomonas*細菌，對柑橘潰瘍病菌具有拮抗作用，能阻止病斑的擴大，及

減輕潰瘍病的發生；可惜的是，此種 *Pseudomonas* 細菌也能在甜菜、菠菜、豇豆、甘藍、蘿蔔、黃瓜等葉片上造成黃暈、壞疽性的斑點，可能係植物病原細菌的一種[50,51]。*Erwinia herbicola* 是一種腐生細菌，在柑橘潰瘍病病斑裡常和潰瘍病菌存在一起，前者不能自己利用柑橘葉片、枝條、果實的營養物質，而必須依賴後者侵入寄主後，誘導營養物質的產生與釋放，才能加以利用，但它不影響柑橘潰瘍病菌的病原力[21]。*Bacillus subtilis* 在潰瘍病病斑裡也常和潰瘍病菌在一起，有些菌株，對柑橘潰瘍病菌也具拮抗性[34]。

病原型

柑橘潰瘍病菌，依其病原性之不同，可區分爲五個病原型（Pathotype）（表1）；A病原型，其分佈遍及於全世界，對葡萄柚、甜橙、檸檬、墨西哥萊姆爲害最強[32]；B病原型，分佈於阿根廷、巴拉圭、烏拉圭，對檸檬、墨西哥萊姆具強病原性[5]；C病原型分佈於巴西，對墨西哥萊姆具有強病原性[45]；D病原型，分佈於墨西哥，在墨西哥萊姆葉片上形成病斑[54]；上述四病原型皆可使植株產生凸起、木栓化、外圍具有黃暈的病斑，其中A病原型出現機率較高，其餘則少見；而E病原型分佈於美國佛羅里達州，在葡萄柚、甜橙、枳殼及枳殼和葡萄柚間的 Swingle citrumelo 雜交種等葉片、枝條及果實上形成扁平水浸狀病斑[55]。

表1. 柑橘潰瘍病菌的病原型、其寄主範圍及分佈[73]

Table 1. Pathotypes, relative pathogenicity, host range, and distribution of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*[73]

Citrus spp.	Commom name	Relative pathogenicity^z Pathotype / Distribution				
		A (Asia and other areas)	B (Argentina)	C (Brazil)	D (Mexico)	E (America)
C. sinensis	Sweet orange	+ + +	+	–	–	(+)
C. paradisi	Grapefruit	+ + +	+	–	–	(+)
C. limon	Lemon	+ + +	+ + +	–	–	
C. reticulata	Mandarin	+	+	–	–	
C. aurantifolia	Mexican lime	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	
P. trifoliata x *C. paradisi*^{y}	Swingle citrumelo					(+)

z + – + + +, Degree of pathogenic reaction; –, No disease development; (+), Flat and water – soaking lesion.

y *P, Poncirus.*

自1975年以來，從台灣各地區所栽植的各柑橘種、栽培種及雜交種等所產生的潰瘍病病斑共分離出383個菌株，分別對柳橙或墨西哥萊姆皆具病原力而產生凸起、木栓化、外圍具有黃暈的病斑；其中之40個菌株，分別依多針法接種於葡萄柚、柳橙、檸檬、椪柑、墨西哥萊姆的葉片上，於20～22℃下三星期後，皆產生凸起、木栓化、外圍具有黃暈的病斑，其中之80%菌株屬於A病原型，其餘的20%菌株，由於呈現不屬於上述五病原型的病原性，或可能屬於新的病原型(75)。

病原性基因

柑橘潰瘍病菌A病原型3213菌株的*pthA*病原性基因，經轉殖至*Escherichia coli* DH5 α細胞內的pSS10.35質體，依接合交配，則移轉至柑橘潰瘍病菌E病原型的3048 菌株和*X. campestris* pv. *alfalfae*、*X. campestris* pv. *cyamopsidis*，以及*X. campestris* pv. *phaseoli*、*X. campestris* pv. *malvacearum*等的細胞內，經接種後，前三種細菌在葡萄柚葉片上能形成凸起的類似A病原型的潰瘍病病斑(61,62)。

質體及轉位子

從日本、阿根廷、巴西、巴拉圭等國家分離的柑橘潰瘍病菌含有機能不明的質體(Plasmids)(6)，其分子量有7～100kb不等(53)；而台灣柑橘潰瘍病菌的53%之菌株也含有質體(89)。從其中之XW47菌株可偵測出pXC2、pXC3、pXC4、pXC5等4個質體，其分子量各具29.5～52.7kb(83)；XW45菌株含有分子量各爲35和64kb的pXW45N及pXW45J 質體(圖1)，此等質體各具有5.55和6.95kb長的ISXC*4*及ISXC*5*轉位子(Transposable elements)(圖2)，而此等轉位子能分別依約10^{-5}和10^{-7}的頻率轉移至*X. campestris* pv. *citri* XAS4501及*Escherichia coli* HB101細胞內的RP4質體上的*tet*基因內(65)。

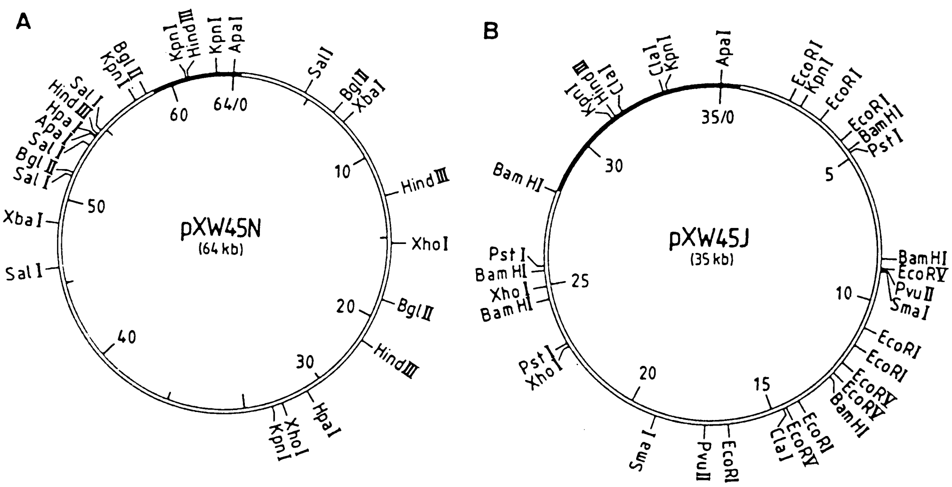

圖 1. pXW45N(A)及pXW45J(B)質體的物理圖譜。硬線分別表示ISXC*4*、ISXC*5*轉位子在pXW45N、pXW45J質體的位置(65)。

Fig. 1. Physical maps of plasmids pXW45N (A) and pXW45J (B). The solid lines on the maps of pXW45N and pXW45J represent the locations of transposable elements ISXC*4* and ISXC*5*, respectively(65)

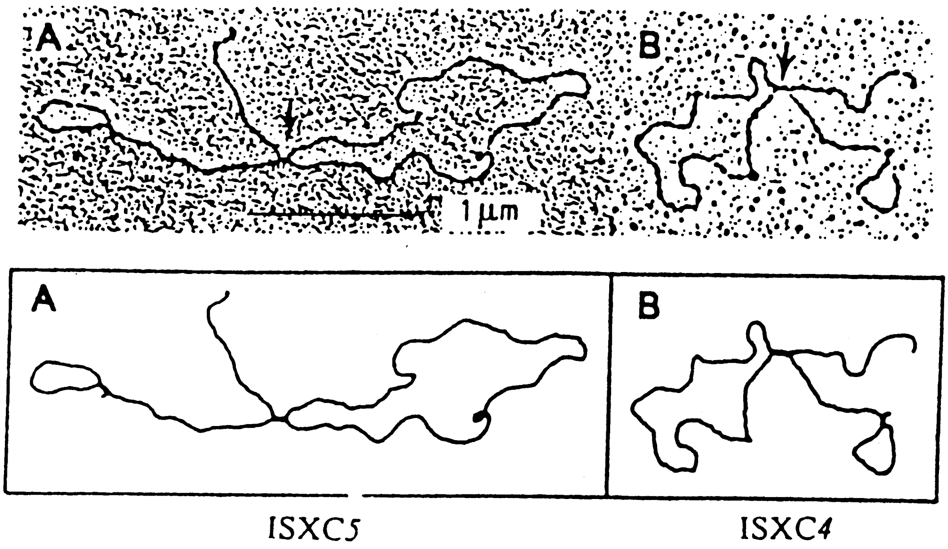

圖2. pAXC58(A)及pAXC41(B)質體間的分子間雜交後ISXC5及ISXC4轉位子的電顯圖。ISXC5(A)及ISXC4轉位子的逆重複用箭頭記號表示[65]。

Fig. 2. Transposable elements ISXC4 and ISXC5 after intramolecular hybrids of plasmids pAXC58 (A) and pAXC41 (B) are indicated by arrows[65]

噬菌體

噬菌體的種類：柑橘潰瘍病菌的噬菌體，依其形態可分爲絲狀及頭部帶有長短尾等二種，極大部份皆僅感染其寄主細菌。Cf[9]、Cf16[85,88]、Cf29、Cf32、Cf99、Cf117和Cf134[74]、CP1、CP2[68]、CP115和CP122[81,86]等噬菌體皆由柑橘潰瘍病菌或其所感染的病葉組織所分離。

Cf和Cf16噬菌體：Cf噬菌體，約爲1008nm長，其寄主專一性相當高，只能感染 *X. campestris* pv. *citri*，不能感染 *X. campestris* pv. *oryzae*、*X. campestris* pv. *cyamopsidis*、*X. campestris* pv. *pruni*、*X. campestris* pv. *visicatoria*、*X. campestris* pv. *monihotis* 和 *Escherichia coli*。Cf侵入 *X. campestris* pv. *citri* 後，其吸光度減低，侵入後4小時，寄主細菌菌落數目也顯著減少，顯示被侵害的寄主細胞有分裂減少或因細胞被Cf殺死溶解的現象。Cf侵入寄主後10小時即能形成澄清型的溶菌斑，由此更可證實Cf確實有溶解寄主細胞，影響其生長速度(9)。Cf的基因體爲7.62 kb，除了四種常見的Adenine、Thymine、Cytosine、Guanine核甘酸外，另含有極少量的不尋常的核甘酸[90]，此種核甘酸不是 *E. coli* 的T2、T4、T6噬菌體所含有的5-甲基去氧核糖核甘酸(5-hydroxy-methylcytosine)[60]，也不是 *X. campestris* pv. *oryzae* 的Xp12噬菌體所含有的5-methylcytosine。Cf16噬菌體是從柑橘潰瘍病菌的XW16菌株分離[88]，約爲1314nm長[8]，其基因體爲7.6kb[11]，感染寄主後並不會影響寄主的生長[8]，而且可形成十分混濁的溶菌斑[85]，Cf16侵入後其基因體能插入寄主染色體中[13]，故爲溫和性噬菌體[72,85,88]。Cf16只能感染所測試的柑橘潰瘍病菌部份菌株和 *X. campestris* pv. *phaseoli* 的XP4菌株，但不能感染其他植物病原細菌以及土壤、臨

床、環境等所分離的細菌[85]。由此可見，Cf16與Cf的生活史有顯著的差別。Cf 和Cf16在大部份溶液中皆甚不穩定。Cf只有保存在蒸餾水、0.1M磷酸緩衝液、pH 7.0 和PS培養基中呈現穩定外，在0.1mM Tris緩衝液、50mM硫酸銅、硫酸銨、氯化鎂、氯化鈉和氯化銫(1.29g / ml)等一價或二價離子溶液內，其活性降至25～60%，若在1%氯仿、0.005% Sodium lauryl sulphate置2小時後，Cf完全失去活性[9]。Cf16只在牛肉煎汁培養基內和蒸餾水中活性可達100%，在生理食鹽水、GY培養基中會失去活性；同樣地，在50mM的Tris、磷酸緩衝液、硫酸銨、硫酸亞鐵、醋酸鉛、氯化鉀、氯化鈉和檸檬酸鈉各種溶液中處理1小時後，其活性皆降爲0.001%，在50mM的氯化鈣、硫酸鎂和氯化鎂仍各自維持2.3、0.25和0.43%的活性；保存於丙銅、氯仿、酒精、正丁醇和二甲苯5分鐘後即完全失去活性[85]。Cf和Cf16在60~70℃時10分鐘後則活性漸低，至80 ℃完全失去活性[9,85]。距15 – W UV光60公分下照射15秒，Cf16活性已降爲5%， 135秒後則完全喪失活性[85]。

Cf16噬菌體感染其寄主的新潛溶過程: Cf16侵入寄主細胞後，先複製大量RF DNA，在細胞不斷進行分裂時，一組RF DNA插入於寄主染色體，其餘RF DNA和染色體共同複製，RF DNA會由細胞中逐漸丟失，最後僅剩有插入於寄主染色體中的RF DNA狀態噬菌體的基因體，成爲穩定的能釋放噬菌體的潛溶菌；此種以插入寄主染色體的Cf16 RF DNA與Cf16 RF DNA共同生存於寄主細胞内之潛溶過程稱爲新潛溶過程(Neolysogenization)[13]。RF DNA插入位置(*attP*)在Cf16 RF DNA限制酶圖譜中*Bgl*II和*Sst*II切點中間，即 以*Eco*RI爲原點時，染色體的69.2至73.8分鐘位置。Cf16 – v1爲Cf16之突變體，侵入寄主後亦經由上述的新潛溶過程，將其基因體插入寄主染色體，其插入的形式、方向與位置完全和Cf16相同。Cf16、Cf16 – v1的*attP*和寄主細菌染色體DNA上附著位置(*attB*) 有一完全配對的5' – TATACATTATGCGAA – 3'核心序列，Cf16是以此15bp爲核心，利用重組互換方式插入寄主染色體中[11](圖3)。

CP1、CP2、CP115和CP122噬菌體：此等噬菌體皆分別由柑橘潰瘍病病斑所分離[68,81,86]。CP1爲球形頭部，帶有一條長尾，而CP2爲多邊球形，具有一條短尾[68]。從葡萄柚葉部潰瘍病病斑分離的CP115是具有多邊形的毒力噬菌體，内含有線狀、分子量爲40.6kb、雙股DNA的基因體，而從柳橙葉部潰瘍病病斑所分離的CP122則具有球狀帶有長尾的溫和噬菌體，内含有線狀、47.3kb的雙股DNA爲其基因體。兩者僅感染柑橘潰病菌，但不能感染其他所供試的細菌[81,82,86]。

病原菌的遺傳

變異

柑橘潰瘍病菌菌株間在菌落形態、菌體大小、莢膜形成、過氧化氫放氧酶、白明膠水解、硝酸鹽還原及碳水化合物利用能力等特性上有差異[1,19,43,68,69]。台灣所分離的柑橘潰瘍病菌，在其生長速度、耐鹽性、營養需求性、對噬菌體的感受性、以及對農藥的感受性和抗性，顯示菌株間有變異存在[89]。

突變

柑橘潰瘍病菌在固態培養基平板上所形成的菌落形態甚不穩定[10,69]。在Nutrient 或LB

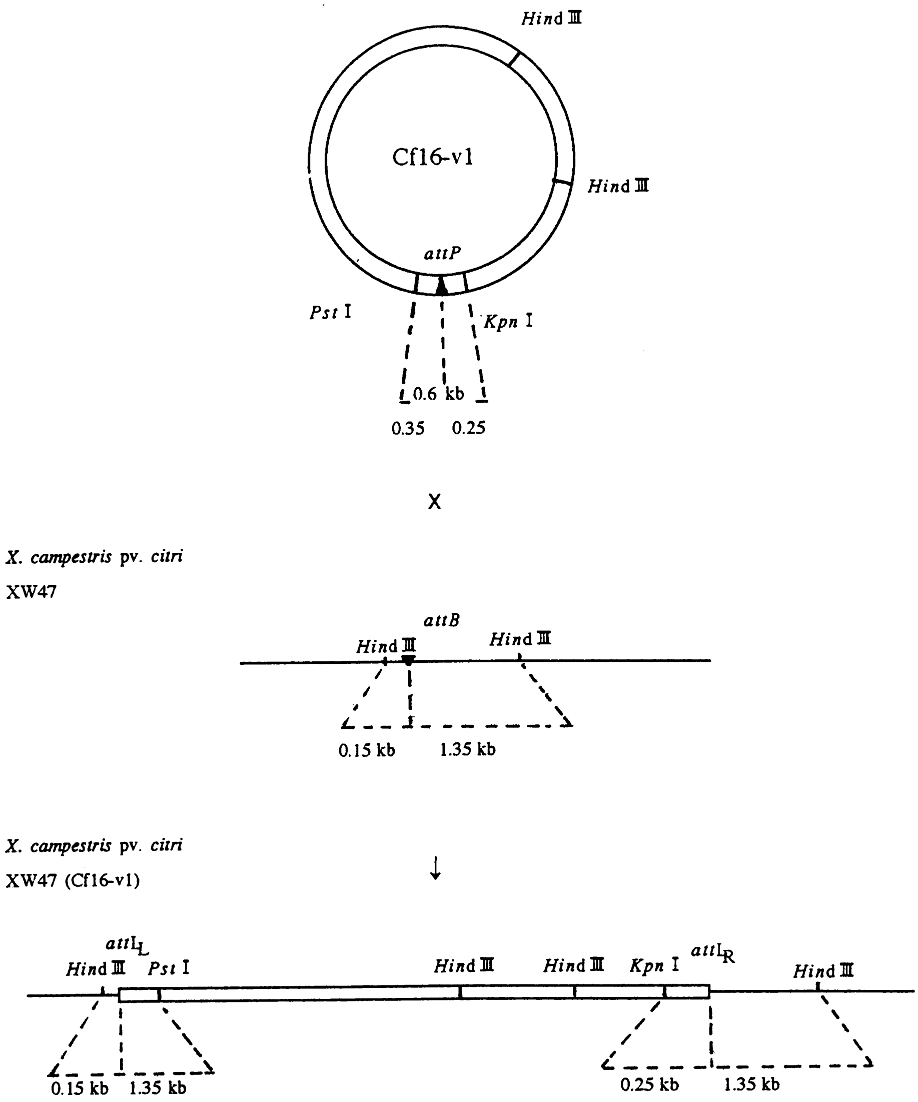

圖3. Cf16－v1噬菌體的RF DNA以其*attP*插入在其寄主細菌（*Xanthomonas campestris* pv. *citri* XW47）染色體上的*attB*位置上（修改過[11]）。

Fig. 3. Integration of the Cf16－v1 RF DNA by *attP* into the *attB* of its host (*Xanthomonas campestris* pv. *citri* XW47) chromosome. From the sequencing data, the following was established: (a) the phage core was located approximately 250 bp 3' to the *Kpn*I site and 350 bp 5' to the PstI site on the 0.6－kb phage 5'KpnI－PstI－3' frag－ment and (b) the host core was located approximately 150 bp 3' to a *Hin*dIII site on the 1.5－kb HindIII "host－attachment site" fragment. Therefore if Cf16－v1 integrates by a mechanism similar to λ, a 0.5－kb 5'－*Hin*dIII－3'－*Pst*I fragment and a 1.6－kb 5'－*Kpn*I－3'－*Hin*dIII fragment can be predicted to contain the left and the right phage－host junction, provided no *Pst*I or *Kpn*I site interrupts the 150－bp 5'－*Hin*dIII－core－3'or the 1350－bp 5'－core－*Hin*dIII－3' host fragment (Modified[11]).

培養基平板上，除形成典型的大而黃色的菌落外，因自然突變，偶而出現一種小而白色的菌落；當此種突變在菌體中發生後，其子代不斷以不規則方式發生菌落變異。相同的情形也發生在被Cf16的Cf16－v1突變體所感染的細菌上。此種細菌可能帶有一種轉位子，可直接或間接造成細菌細胞分裂速度和菌落顏色突變的因素(12)。柑橘潰瘍病菌的XW82、XW118菌株，係分別自台中、嘉義所種植的檸檬及晚生橙葉部潰瘍病病斑所分離，皆爲半胱氨酸（Cysteine）的自然營養缺陷菌株(89)，而後者則又爲非游動性（Non－motile）菌株(74)。柑橘潰瘍病菌72個菌株(89)的全部或部份對快得寧（Quinolate 35.5% WP）、大生M－45（Dithane M－45 80% WP）、萬安水粉（Caocobre sandoz 56% WP）、鏈黴素（Streptomycin 12.5% sol'n）、四環黴素（Tetracycline 30% WP）、嘉賜銅（Kasuran 81.3% WP）、亞鈉銅（Yonepon 40% WP）、護粒丹（Hinodan 35% WP）、免賴得（Benlate 50% WP）、多保淨（Topsin－M 70% WP）等農藥顯示感受性，但是其中之部份菌株則出現10^{-8}～10^{-6}頻率的抗性突變菌(89)；此等72個菌株全部或部份對鋅錳乃浦（Macozeb 80% WP）、免賴得（Benomyl 50% WP）及鎳乃浦（Sankel 65% WP）等農藥也產生抗性突變體(79)。從花蓮晚生橙葉部潰瘍病病斑所分離的XW 47菌株(88,89)，經50 ug／ml的Nitrosoguanidine處理30分鐘，可誘導出精氨酸（Arginine）、半胱氨酸（Cysteine）、組氨酸（Histidine）、異白氨酸（Isoleucine）、脯氨酸（Proline）、苯基丙氨酸（Phenylalanine）、酪氨酸（Tyrosine）等營養缺陷突變體及對CP115噬菌體的抗突變體(74)。

噬菌體誘導的突變

Cf16爲第一個被發現具有潛溶性的絲狀噬菌體(83,88)，如同*Escherichia coli*的λ(56,57)、Mu(3)、D108(17)、*Vibrio cholerae*的VcA1(35)、*Agrobacterium tumefaciens*的ψ(15)等溫和噬菌體，其DNA插入在寄主細菌染色體上(13)，依10^{-1}的頻度，使其寄主細菌產生突變(72,80,88)。柑橘潰瘍病菌的XW47菌株，被Cf16感染後，則誘導出半胱氨酸（Cysteine）營養合成突變菌株（Cys^-mutant）。此等Cys^-突變菌株已失去利用檸檬酸鹽（Citrate）的能力，及無法分解半乳糖（Galactose）、海藻糖（Trehalose）、木糖（Xylose）、甘露糖醇（Mannitol）、甘露糖（Mannose）、甘油（Glycerol）和糊精（Dextrin）等碳水化合物，而對柳橙顯現出致病力的降低。Cf16感染其寄主細胞後，其DNA則插入於其寄主染色體內，因此，由Cf16噬菌體所誘導的Cys^-突變，可能因Cf16 DNA插入於其寄主細胞的*cys*基因而所引起的(72,88)。柑橘潰瘍病菌由Cf16誘導的Cys^-突變，也顯現生長速度、對噬菌體感受性、以及質體的存在等特性的變化(83)。柑橘潰瘍病菌的XW45菌株，被Cf16絲狀噬菌體潛溶以後，也能以約爲10^{-1}的頻率誘導組氨酸合成的突變(78,80)；所形成的全部或部份His^-突變菌株，與XW45野生型菌株不同，不能利用檸檬酸鹽，不能分解海藻糖、木糖、甘露醇、甘露糖、甘油、果糖和乳糖，且此等His^-突變菌株回復時，未失去其潛溶性，而大部份His^+回復菌株依然保持此等變化的特性。XW45野生型菌株所含有pXW45N 和pXW45J二個質體，在有些His^-突變菌株及His^+回復菌株細胞內，能融合成爲另一質體或再分裂成爲原來的質體。Cf16噬菌體在His^-突變菌株和His^+回復菌株細胞內均不呈現游離質體狀態的DNA；因此，可推測其原噬菌體可能插入寄主染色體受影響基因以外的一定位置上(80)。Cf29、Cf32、Cf99、Cf117和Cf134等絲狀噬菌體是分別從柑橘潰瘍病菌的不同菌株所分離，當感染柑

橘潰瘍病菌XW47菌株時，也會誘導麩氨酸（Glutamic acid）、苯基丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸等營養缺陷突變，而所形成的此等突變菌株同時也不再能分解木糖、海藻糖及甘露醇糖，而部份則對葡萄柚、椪柑、或墨西哥萊姆等降低或消失其致病力[74]。

轉導

柑橘潰瘍病菌的XW118游動突變菌株的游動性，在M.O.I.爲0.005的情況下，經Cf29、Cf32、Cf99、Cf117、Cf134等絲狀噬菌體，依頻率約爲10^{-7}，可轉導（Transduction）至XW118非游動性野生型菌株，但不能轉導合成半胱氨酸、苯基丙氨酸、組氨酸、異白氨酸、脯氨酸、酪氨酸及抗鏈黴素等基因；此等游動性轉導菌株變成生長緩慢，改變對CP115噬菌體的感受性，而且部份則對葡萄柚、椪柑、或墨西哥萊姆減低或消失其致病力[74,76]。

轉染

Cf絲狀噬菌體的複製型雙股DNA（RF DNA），可利用電孔法成功地進入柑橘潰瘍病菌XW47菌株的細胞。細菌懸浮液先以含有MgSO4及NaCl的Tris緩衝液處理，加入DNA後，以12.5KV / cm高壓電下，可得到5.2 x 10 pfu / ug DNA高效率之轉染（Transfection）。另一絲狀噬菌體，Xf，其RF DNA也可利用同法進入*X. campestris* pv. *oryzae* 604，其轉染效率爲3.1 x 10 pfu / ug DNA，而Xp10噬菌體的雙股DNA也可以電孔法轉染至其同樣的寄主細菌。至於單股的絲狀噬菌體DNA，與雙股RF DNA一樣，可成功地轉染*X. campestris* pv. *citri*或*X. campestris* pv. *oryzae*的菌株。無論Cf或Xf，其DNA 皆可藉由此電孔法轉染*X. campestris*的非寄主菌株，雖然其轉染效率不若原寄主細菌爲高。由Cf轉染菌釋放的噬菌體，其DNA可和Cf DNA進行雜交反應，而由Xf轉染菌釋放的噬菌體，其DNA也可與Xf DNA作用，可證明以電孔法進入的噬菌體DNA可在非寄主細菌內複製[91]。

柑橘細菌性斑點病

柑橘潰瘍病菌五個病原型中的E病原型細菌，1984年於美國佛羅里達州柑橘苗圃，發生於枳殼和葡萄柚間的Swingle citrumelo雜交種，使植株產生扁平、水浸狀的病斑，因其病徵型態和其他四個病原型細菌引起而產生的凸起、木栓化、外圍具黃暈的病斑有顯著差異，所以現今少數學者稱此病原型所引起的柑橘病害爲細菌性斑點病（Bacterial spot）[55]。Gabriel等[18]於1989年，基於基因體指紋和RFLP分析結果（圖4B），提議將柑橘潰瘍病菌的A、B / C / D、E病原型分別重新命名爲*Xanthomonas citri*、*X. campestris* pv. *aurantifolii*和*X. campestris* pv. *citrumelo*。柑橘潰瘍病和細菌性斑點病皆會使柑橘枝條、葉、果實形成病斑，尤其是潰瘍病發生嚴重者樹勢衰微，落葉、果實早熟、落果，影響柑橘的生產、品質、市場價格，對柑橘貿易來說乃是一重大危害，在經濟上損失頗大，所以美國柑橘於1984至1986年受細菌性斑點病侵襲之際，即立刻採取焚撲與嚴謹地檢疫工作並設研究機構，例如在馬利蘭州的美國農部植物科學研究所、在佛羅里達州的美國園藝科學研究所，以及佛羅里達大學和佛羅里達州農業廳等，對柑橘潰瘍病和細菌性斑點病的偵測及鑑定，生化、血清、DNA分析的比較，柑橘品種的罹病度，流行病學的研究與尋求經濟有效的撲滅及防治措施等[26]。學者們就二者之間的寄主範圍、病斑型式[55,59]、族群動向[27,63]、流行病學[24,25]、血清學[1,4,52]、及蛋白質電泳圖譜（SDS－PAGE）與脂肪酸組成型式（FAME）分析[66]、DNA指紋及其限制

酶片段多型性與同源性[29,30,66]等曾進行一系列分析。就族群動向與流行病學而言，柑橘潰瘍病的傳播、殘存均較細菌性斑點病快而久，血清及RFLP分析顯示潰瘍病病菌之間同源性高，而細菌性斑點病病菌之間同源性低，二者間有明顯之差異。Gabriel等[18]於1989年所提議的*X. citri*，或*X. campestris* pv. *citrumelo*一學名及其所引起的柑橘細菌性斑點病，雖現今仍有少數學者在使用[2,4,25,61,62,63]，但Vauterin等[66]於1991年利用DNA同源性、蛋白質及脂肪酸組成和對照昔日學者的研究來分析此五病原型（圖4），則不贊同上述說法，認爲不應該只以RFLP技術對*Xanthomonas campestris* pv. *citri*作重新分類；而Graham andGottwald[26]、Stall and Giverolo[58]、Young et al.[92]等學者於1991年皆主張如此；故目前多數研究者，包括筆者等[71～89]，尚繼續稱此五病原型所引起的柑橘病害及其病原菌各爲潰瘍病及*X. capestris* pv. *citri*。

柑橘潰瘍病的鑑定及偵測

無論是柑橘外銷或進口，爲保護國內的柑橘栽培事業，快速準確的病原菌偵測及鑑定，更是檢疫上不可或缺日益求新的技術。柑橘潰瘍病及其病原菌的鑑定及偵測，目前有下述五種方法。準確又快速的偵測及鑑定，乃有賴綜合運用。

病原性測試法

將病菌接種到柑橘植株，判斷病斑發展的病原性測試法，雖所耗時間長，卻是簡單又準確的方法。Goto等[22]於1970年將柑橘潰瘍病菌L21菌株的純培養液或混有土壤的懸浮液用帶有1/4注射針的0.5ml注射筒，從夏橙葉片主脈附近將7ul/cm^2的量注入葉肉內，1～3週後則可觀察其發病及病斑的形成情形；假若，懸浮液中含有約10^2－10^3/ml 的細菌時，發病率可達100%～65%，此則所謂葉肉注射接種法。

Koizumi[39]於1971年提出的針傷接種法，是用裝在橡皮栓直徑有0.8mm 15支針在夏橙、檸檬或溫州蜜柑葉片刺傷，然後用棉花球將柑橘潰瘍病菌E－KC6501 菌株的2 x 10^2 cells/ml懸浮液接種，將葉柄插入塑膠箱内的水裡，套上塑膠袋，置於25℃定溫箱内，經7～8日後，則出現病斑。Wu[70,75,76,77]及Wu等[84,86,87,88,89]從1972年採用此法一改稱爲多針法，在溫室内將接種後的夏橙、柳橙或葡萄柚等葉片套上塑膠袋2日，3～5日後病斑則形成。

生理生化特性測試法

Goto等[23]於1980年報告，柑橘潰瘍病菌的B病原型菌株，和A病原型不同，在Peptone－sugar agar plates上所形成的菌落小，不利用乳糖及麥芽糖。此種以生理生化特性的測試法，雖一直普遍被採用，但費時且繁瑣。經不斷改良，最近，Verniere等[67]於1993年用Biolog substrate utilization system檢查對95種碳水化合物的利用代謝，於24小時内則可完成，但準確度最高才達70%；唯採用此法對黑藻糖（Fucose）、半乳糖（Galactose）及Alarinamide等碳水化合物的利用情形，可區分柑橘潰瘍病菌A、B、C、D 、E等五病原型。

噬菌體測試法

CP1和CP2噬菌體[68]能感染從日本各地所分離的柑橘潰瘍病菌近800個菌株之98～99%

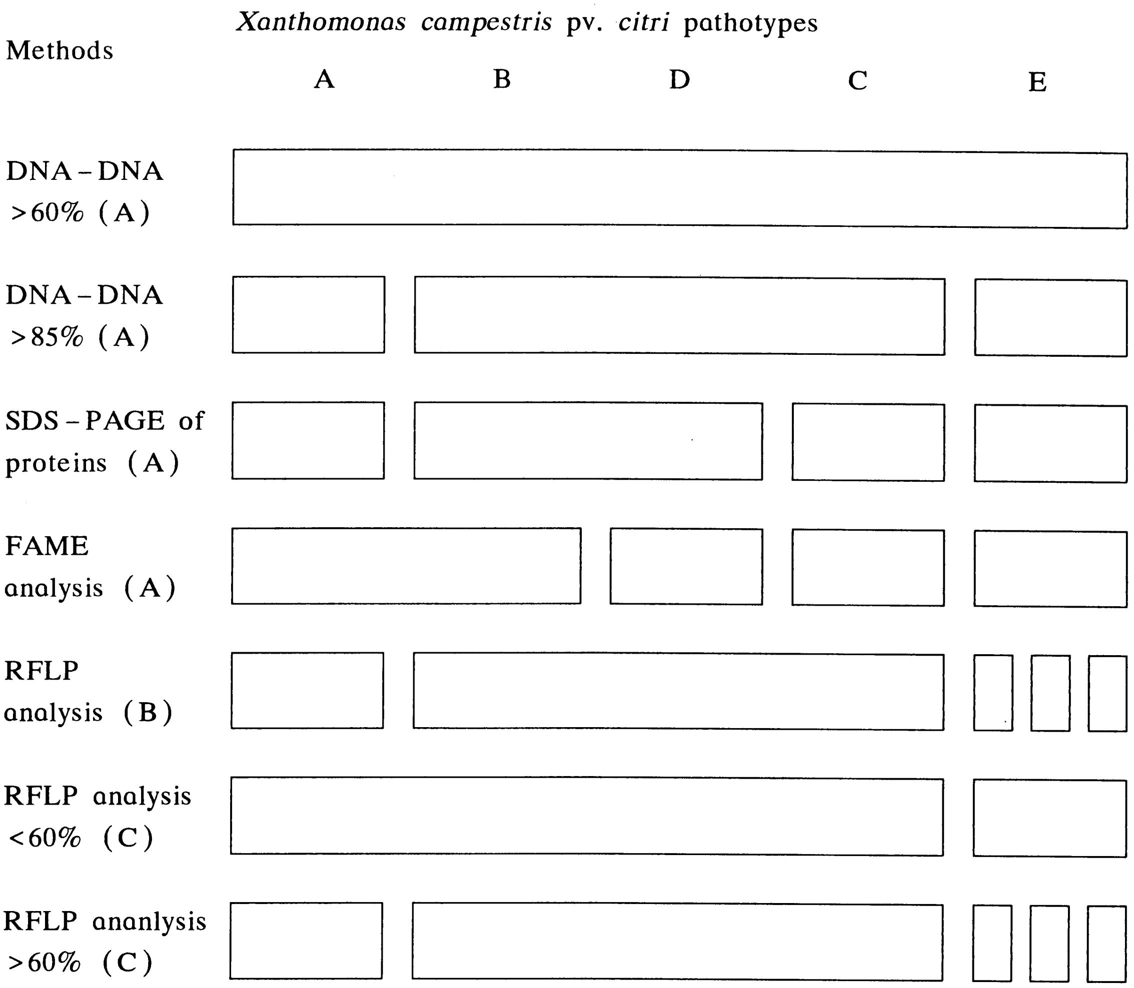

圖 4. 柑橘潰瘍病菌五個病原型在 DNA 雜合、蛋白質、脂肪酸 (A)[66]、RFLP (B)[18] 及 (C)[30] 等分析的比較。

Fig. 4. Schematic comparison of the pathotypes of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* obtained by different methods studied by Vauterin *et al.*[66] (A), Gabriel *et al.*[18] (B), and Hartung and Civerolo[30] (C)。

[46,48,68]，因此，基於此種高度的專一性，Obata 等[47]於 1969 年則發展出一種所謂 CP1、CP2 噬菌體的測試法技術，以偵測無菌的溫州蜜柑輸出至美國。台灣所分離的 CP115 和 CP122 噬菌體，據 Wu 等[86]於 1993 年報導，能感染從台灣各地各柑橘種、栽培種、雜交種所分離的 138 個菌株中之 135 株，感染率也高達 98%，但不能感染所供試 50 多種的植物病原細菌及土壤、環境、臨床等細菌；因此，此等噬菌體共同使用時，顯然地可應用於台灣以鑑定柑橘潰瘍病菌。此等噬菌體對柑橘潰瘍病菌的專一性如此之極高，CP115、CP122 噬菌體除其寄主細菌外不感染其他細菌，且 24 小時內即可完成，所以，噬菌體測試法可稱得上是一種快速、簡便且經濟的技術。

血清測試法

酵素連結抗體法（ELISA）: Civerolo 及 Fan[7] 於 1982 年利用柑橘潰瘍病菌 A 病原型的 XC62 菌株和 C 病原型的 XC70 菌株的抗血清，以 ELISA 技術，可區分 A 、 B 、 C 三病原型。A 病原型和 B 、 C 病原型的血清關係較遠，而 B 、 C 二病原型則較相近，且細菌可被偵測的最低濃度爲 $10^4 - 10^5$ cells / ml 。此法不但可用於鑑定純培養的細菌，也可用於田間診斷。

聚合碳酸膜固定免疫螢光法（MEI）: Brlansky 等 [4] 於 1990 年將柑橘潰瘍病菌的 A 病原型 XC62 或 E 病原型 FLN 菌株細胞經 5.0um 及 2.0um 的聚合碳酸膜過濾後，分別與標有含有由 XC62 或 FLN 細菌細胞製成的 IgG 抗血清反應，利用 Epifluorescene 顯微鏡觀察，可偵測出最低濃度爲 $10^2 - 10^3$ cells / ml ，而可區別 A 、 E 及 B ， C ， D 等三群（表 2）。自美國佛羅里達州柑橘苗圃、柑橘園及住家庭園等柑橘葉片、枝條、果實上顯出有潰瘍病、細菌性斑點病病徵材料，用此法，對柑橘潰瘍病菌 A 或 E 病原型菌株所製備的抗血清分別有反應（表 3）。因此， MEI 法皆能做爲柑橘潰瘍病菌的鑑定及偵測用。

單元抗血清反應： Alvarez 等 [2] 於 1991 年利用融合瘤技術製備對柑橘潰瘍病菌 A 、 B 、 C 、 D 、 E 五個病原型菌株各有特異性的 A1 、 A2 、 B2 、 B3 、 C1 、 T1 、 T2 、 CBS1 、 CBS2 、 CBS3 等 10 個單株抗體，除 A2 和 C1 單株抗血清外，其餘的，對其他病原型或 *X. campestris* 的其他 Pathovars 的細菌，皆顯示有反應（表 4）。

DNA 分析法

跟著分子生物技術的精進，利用基因體指紋法（Genomic fingerprinting）、 DNA－DNA 雜合法（DNA－DNA hybridization）、 RFLP 分析法（Restriction fragment length poly－morphisms, RFLP）及聚合酵素連鎖反應（Polymerase chain reaction（PCR））等技術可準確地鑑定或區別柑橘潰瘍病菌各病原型。 Hartung 和 Civerolo[29] 於 1987 年將柑橘潰瘍病菌的染色體 DNA ，經 *Eco*RI 限制酶處理，電泳分析，將所得的 DNA 指紋比較之後，則可區分 A 、 B 、 E 等病原型。 Hartung[28] 於 1992 年將柑橘潰瘍病菌的染色體 DNA 經 *Bam*HI 限制酶處理，電泳分析後，以 pFL1 質體作爲探針，行雜合作用，則可區別出柑橘潰瘍病菌 A 、 B 、 C 、 D 等四病原型，以及所供試的 *X. campestris* pv. *bilvae* 和 *X. campestris* pv. *vignicola* 等細菌。將柑橘潰瘍病菌五個病原型細菌的染色體 DNA 用限制酶處理，電泳分析後，和 RFLP 探針進行雜合作用，分析各菌株間的相似係數，則獲得其 RFLP 值。 Hartung 和 Civerolo[30] 於 1989 年用此法在分析值小於 60% 時可將柑橘潰瘍病菌分爲 A / B / C / D 及 E 二群，大於 60% 時則分爲 A 、 B / C / D 、 E 三群，而 E 又可分爲三小群（圖 4C）。 Vauterin 等 [66] 於 1991 年依 RFLP 值，大於 60% 時柑橘潰瘍病菌五個病原型之間則無可區分，而於大於 85% 時則可區分爲 A 、 B / C / D 及 E 三群。除此之外， Gabriel 等 [18] 於 1989 年根據 RFLP 分析結果，也將柑橘潰瘍病菌五個病原型分爲 A 、 B / C / D 、 E 三群。 Hartung[31] 等於 1993 年，從柑橘潰瘍病菌的 A 病原型菌株接種而產生的潰瘍病病斑所分離純化的 DNA ，經 PCR 技術的增殖，電泳分析後，以含有 572bp *Eco*RI 限制酶片段插入的 pFL1 質體爲探針進行雜合作用，可偵測到 25pg 的 DNA 或 10^3cells / ml 濃度的細菌。

表2. 柑橘潰瘍病菌五個病原型用聚合碳酸膜固定免疫螢光法的鑑定[4]

Table 2. Reactions of bacterial strains with antisera prepared to *Xanthomonas campestris* pv. *citri* pathotype E strain XC62 and pathotype E strain FLN in membrane entrapment immunofluoresence[4]

Bacteria tested	No. of reaction to antisera (positive / tested) XC62	FLN
X. campestris pv. *citri* pathotype E	0 / 25	14 / 25
X. campestris pv. *citri* pathotype A	18 / 18	0 / 18
X. campestris pv. *citri* pathotype B, C, and D	0 / 10	0 / 10
Nonpathogenic		
X. campestris isolated from citrus	0 / 16	0 / 16
Other phytopathogenic		
X. campestris pathovar *alfalfae*	0 / 4	1 / 4
Other bacteria z)	0 / 40	0 / 40

z Other bacteria: *X. campestris* pathovars *begoniae, bilvae, campestris, dieffenbachiae, hederae, malvacearum, maculifoliigardeniae, peiargonii, phaseoli, poinseti icola, pruni, manihotis,* and *vesicatoria; Agrobacterium tumefaciens, Clavibacter michiganense* subspecies *michiganense* and *nebraskanese, Erwinia herbicola, Pseudomonas aeruginosa, P. cichorii, P. solanacerum, P. viridiflava, P. syrigae* pv. *tomato, P. syringae* pv. *syringae*, and *Xyella fastidiosa.*

表3. 柑橘潰瘍病菌A及E病原型用聚合碳酸膜固定免疫螢光法在田間的偵測[4]

Table 3. Reactions of bacteria from field samples with symptoms of 'citrus bacterial spot' and citrus canker with antisera to bacteria cousing 'citrus bacterial spot' and citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* pathotype E strain FLN and pathotyo pe A strain XC62, respectively[4]

Location	Antisera reaction FLN	XC62
	(positive / tested)	
Citrus nursery	15 / 36	0 / 36
Door yard	0 / 30	26 / 30
Commercial orchard	0 / 17	17 / 17

表4. 利用單元抗體鑑定柑橘潰瘍病菌五個病原型[2]
Table 4. Monoclonal antibodies used to characterize strains of *X. campestris* pv. *citri* pathotypes[2]

Monoclonal antibody	Prepared from pathotype	Specificity to pathotype (positive / tested)	Other pathovars of *X. campestris*
A1	A	A(34 / 34)	*manihotis*, some strains of pathotype E
A2	A	A(6 / 34)	None
B2	B	B(10 / 12)	*phaseoli*
B3	B	B(2 / 12)	*dieffenbachiae*
C1	C	C(1 / 1)	None
T1	D	D(1 / 10)	*dieffenbachiae*
T2	D	D(1 / 10)	*dieffenbachiae*
CBS1	E	E(98 / 225)	*alfalfae*
CBS2	E	E(98 / 225)	*alfalfae*
CBS3	E	E(8 / 225)	*vitians*

結　　論

柑橘潰瘍病自從1910年代被發現以來，經日本、美國、墨西哥、巴西、阿根廷、中國等主要專家、學者的研究，對其分佈、發生、經濟重要性、病原菌、病害環、以及防治對策等方面有詳細的研究；尤其是，由於在美國佛羅里達州的所謂柑橘細菌性斑點病之興起，此二病害之間的區別，以及其鑑定偵測的技術，則形成近10年來的熱門研究方向。至於後者方面，在病原性、噬菌體、血清、DNA分析等測試法之中，僅Wu等[86]於1993年的CP115、CP122噬菌體除其寄主細菌外又不感染其他的植物病原細菌及臨床、環境、土壤等細菌，以及Brlansky等[4]1990年的聚合碳酸膜固定免疫螢光法，也除對柑橘潰瘍病菌，包括所謂柑橘細菌性斑點病菌，有特異性之外，對所供試的其他細菌則無特異性；因此，其餘各測試法也應比照上述二法，必須繼續開發出對柑橘潰瘍病菌具有特異性的測試法，以便室內或田間的鑑定偵測之用。

參考文獻

1. Alcaraz, L. M. F. de. 1977. Variabilidad de *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow. en aislamientos de distinta procedencia. Fitopathologia 12: 6 – 14.
2. Alvarez, A. M., A. A. Benedict, C. Y. Mizumoto, L. W. Pollard, and E. L. Civerolo. 1991. Analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and *X. c. citrumelo* with mono – clonal antibodies. Phytopathology 81: 857 – 865.
3. Boram, W., and J. Abelson. 1971. Bacteriophage Mu integration : On mechanism of Mu –

induced mutations. J. Mol. Biol. 62: 171 – 178.

4. Brlansky, R. H., R. F. Lee., and E. L. Civerolo. 1990. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* and *X. citri* from citrus using membrane entrapment immunofluorescence. Plant Dis. 74: 863 – 868.

5. Carrera, C. J. M. 1933. A preliminary note on a new disease observed among the citrus plantings of Bella Vista (Corrientes). Bol. Mens. Min. Agric. Nac. , Buenos Aires 34: 275 – 280. (Reviewed in : Stall, R. E. and E. L. Civerolo, Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida, Annu. Rev. Phytopathol. 29: 399 – 420, 1991)

6. Civerolo, E. L. 1985. Indigenous plasmids in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Phytopathology 75: 524 – 528.

7. Civerolo, E. L., and F. Fan. 1982. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by enzyme – linked immunosorbent assay. Plant Dis. 66: 231 – 236.

8. Dai, H., and S. H. Tsay. 1987. Property of Cf16 lysogen. Bot. Bull. Acad. Sinica (Taiwan, ROC) 28: 117 – 122.

9. Dai, H., K. S. Chiang, and T. T. Kuo. 1980. Characterization of a new filamentous phage Cf from *Xanthomonas citri*. J. Gen. Virol. 46: 277 – 289.

10. Dai, H., S. Huang, and K. S. Chiang. 1988. The characterization of a spontaneous segregating Cf16 – v1 lysogen in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Intervirology 29: 207 – 216.

11. Dai, H., T. Y. Chow., H. J. Liao, Z. Y. Chen, and K. S. Chiang. 1988. Nucleotide sequence involved in the neolysogenic insertion of filamentous phage Cf16 – v1 into the *Xanthomonas campestris* pv. *citri* chromosome. Virology 167: 613 – 620.

12. Dai, H., Y. S. Lo, A. Kuo, B. Y. Lin, and K. S. Chiang. 1991. Inheritable instability of colony morphology of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Bot. Bull. Acad. Sinica (Taiwan, ROC) 32: 271 – 277.

13. Dai, H., S. H. Tsay, T. T. Kuo, Y. H. Lin, and W. C. Wu. 1987. Neolysogenization of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* infected with filamentous phage Cf16. Virology 156: 313 – 320.

14. Dowson, W. J. 1949. Manual of Bacterial Plant Diseases, pp. 109 – 127, Adam & Charles Black, London, England.

15. Expert, D., and J. Tourneur. 1982. ψ , a temperate phage of *Agrobacterium tumefaciens*, is mutagenic. J. Virol. 42: 283 – 291.

16. Facett, H. S., and A. F. Jenkins. 1933. Records of citrus canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and United States. Phytopathology 23: 820 – 824.

17. Falen, M., and A. Toussaint. 1980. Chromosomal rearrangments induced by temperate bacteriophage D108. J. Bacteriol. 143: 1029 – 1030.

18. Gabriel, D. W., M. T. Kingsley, J. E. Hunter, and T. Gottwald. 1989. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 14 – 22.
19. Goto, M. 1962. Studies on citrus canker I. (in Japanese with English summary) Bull. Fac. Agric. Shizuoka Univ. (Shizuoka, Japan) 12: 3 – 72.
20. Goto, M. 1980. New taxonomy on phytopathogenic bacteria. (in Japanese) Plant Prot. (Tokyo, Japan) 34: 27 – 34.
21. Goto, M., Y. Tadauchi, and N. Okabe. 1979. Interaction between *Xanthomonas citri* and *Erwinia herbicola* in vitro and in vivo. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 45: 618 – 624.
22. Goto, M., S. Serizawa, and M. Morita. 1970. Studies of citrus canker disease II. Leaf infiltration technique for detection *of Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson, with special reference to the comparison with phage methods. (in Japanese with English summary) Bull. Fac. Agric. Shizuoka Univ. (Shizuoka, Japan) 20: 1 – 19.
23. Goto, M., T. Takahashi, and M. A. Messina. 1980. A comparative study of the strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* isolated from citrus canker in Japan and cancrosis B in Argentina. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 46: 329 – 338.
24. Gottwald, T. R., E. L. Civerolo, S. M. Garnsey., R. H. Brlansky, J. H. Graham, and D. W. Gabriel. 1988. Dynamics and spatial distribution of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* group E strains in simulated nursery and new grove situation. Plant Dis. 72: 781 – 787.
25. Graham, J. H., and T. R. Gottwald. 1990. Variation in aggressiveness of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* associated with citrus bacterial spot in Floridia citrus nurseries. Phytopathololy 80: 190 – 196.
26. Graham, J. H., and T. R. Gottwald. 1991. Research perspectives on eradiation of citrus bacterial disease in Florida. Plant Dis. 75:1193 – 1200.
27. Graham, J. H., T. R. Gottwald, and D. Fardelmann. 1990. Cultivar – specific interations for strains of *Xanthomonas campestris* from Florida that cause citrus canker and citrus bacterial spot. Plant Dis. 74: 753 – 756.
28. Hartung, J. S. 1992. Plasmid – based hybridization probes for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Plant Dis. 76: 889 – 893.
29. Hartung, J. S., and E. L. Civerolo. 1987. Genomic fingerprints of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains from Asia, South America, and Florida. Phytopathology 77: 282 – 285.
30. Hartung, J. S., and E. L. Civerolo. 1989. Restriction fragment length polymorphisms distinguish *Xanthomonas campestris* strains isolated from Florida citrus nurseries from *X. c.* pv. *citri*. Phytopathology 79: 793 – 799.
31. Hartung, J. S., J. F. Daniel, and O. P. Pruvost. 1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1143 – 1148.

32. Hasse, C. H. 1915. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. J. Agric. Res. 4: 97-100.

33. Hayward, A. C., and J. M. Waterston. 1964. *Xanthomonas citri*. C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, No. 11. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

34. Huang, T. C., and M. C. Chang. 1975. Studies on xanthobacidin, a new antibiotic from *Bacillus subtilis* active against *Xanthomonas*. Bot. Bull. Acad. Sinica (Taiwan, ROC) 16: 137-148.

35. Johnson, S. R., B. C. S. Liu, and W. R. Romig. 1981. Auxotrophic mutations induced by *Vibrio cholerae* mutator phage VcA1. FEMS Microbiol. Lett. 11: 13-16.

36. Kawakami, K. 1921. Citrus canker. (in Japanese) Paper Collection of Plant Pathology. pp. 1-114.

37. Kitajima, H. 1978. Diseases of Fruit Trees: Citrus Canker. (in Japanese) Agric. Hortic. (Tokyo) 53: 577-579, and 703-708.

38. Kitajima, H. 1989. A Special Treatise of Furit Tree Diseases. (in Japanese) pp. 8-23. Yokendo Publishing Co., Tokyo, Japan.

39. Koizumi, M. 1971. A quantitative determination method for *Xanthomonas citri* by inoculation into deteched citrus leaves. Bull. Hortic. Res. Sta. Jpn. B11: 168-183.

40. Koizumi, M. 1985. Citrus canker: The world situation. pp. 2-7. In: Proceedings of Citrus Canker: An International Perspective. (L. W. Timmer, ed.) University of Florida, Lake Alfred, Florida, USA.

41. Kuo, T. T., and M. Teng. 1968. 5-Methylcytosine replacing cytosine in the deoxyribonucleic acid of a bacteriophage for *Xanthomonas oryzae*. J. Mol. Biol. 34: 373-375.

42. Lee, H. A. 1918. Further data on the susceptibility of rutaceous plants to citrus canker. J. Agric. Res. 15: 661-666.

43. Lo, T. C., M. S. Kuo, and W. C. Wu. 1956. Studies on the variation of *Xanthomonas citri*. J. Agric. Forest. (Taiwan, ROC) 5: 110-125.

44. Matsuo, N., N. Matsuyama, and T. Wakimoto. 1981. Production of a specific bacteriocin by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 47: 571-574.

45. Namekata, T., and A. R. De Oliveira. 1972. Comparative serological studies between *Xanthomonas citri* and a bacterium causing canker on Mexican lime. pp. 133-134. In: Citrus Canker (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*): An Analytical Bibliography (Rossett, V., E. Feichtenberg, and M. L. Silveira, eds.) Instituto Biologico, Sao Paulo, Brazil, 1982.

46. Obata, T. 1974. Distribution of *Xanthomonas citri* strain in relation to the sensitivity to phages CP1 and CP2. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 40: 6-13.

47. Obata, T., F. Tsuboi, and S. Wakimoto. 1969. Studies on the detection of *Xanthomonas*

citri *by phage technique and the surface seterilization of Unshu orange for export to the United States. Res. Bull. Plant Prot. Serv. (Japan) 7: 26 - 37.*

48. Obata, T., F. Tsuboi, K. Kudo, and T. Imaizumi. 1972. Survey on distribution of the *Xanthomonas citri* strains in relation to phage sencitivity in Shizuoka Prefecture. (in Japanese; abstr.) Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 38: 203.

49. Okabe, N. 1932. Bacterial diseases of plant occurring in Formosa I. J. Soc. Trop. Agric. 4: 470 - 483.

50. Ota, T. 1971. A *Pseudomonas* sp. produces halos on the citrus leaves. I. Inhibitory effects on citrus canker. (in Japanese; abstr.) Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 37: 185.

51. Ota, T., and T. Wakimoto. 1975. Mechanisms of inhibitory effects of an antagonistic bacterium on citrus canker. (in Japanese; abstr.) Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 41: 275.

52. Permar, T. A., and T. R. Gottwald. 1989. Specific recognition of a *Xanthomonas campestris* Florida citrus nursery strain by a monoclonal antibody probe in a microfil - tration enzyme immunoassay. Phytopathology 79: 780 - 783.

53. Pruvost, O., J. S. Hartung, E. L. Civerolo, C. Dubois, and X. Perrier. 1992. Plasmid DNA fingerprints distinguish pathotypes of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. Phytopathology 82: 485 - 490.

54. Rodriquze, G. S., J. G. Garza - Lopez, J. J. Stapleton, and E. L. Civerolo. 1985. Citrus bacteriosis in Mexico. Plant Dis. 69: 808 - 810.

55. Schoulties, C. L., E. L. Civerolo, J. W. Miller, R. E. Stall, C. J. Krass, S. R. Poe, and E. P. DuCharme. 1987. Citrus canker in Florida. Plant Dis. 71:388 - 395.

56. Shimada, K., and R. A. Weisberg. 1972. Prophage lambda at unusual chromosomal locations I. Location of the secondary attachment sites and the properties of the lyso - gens. J. Mol. Biol. 63: 483 - 503.

57. Shimada, K., and R. A. Weisberg. 1973. *E. coli* mutants produced by the insertion of bacteriophage λ DNA. Genetics (Suppl.) 73: 81 - 83.

58. Stall, R. E., and E. L. Civerolo. 1991. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. Annu. Rev. Phytopathol. 29:399 - 420.

59. Stall, R. E., and C. P. Seymour. 1983. Canker, a threat to citrus in the gulf - coast states. Plant Dis. 67: 581 - 585.

60. Stent, G. S. 1963. Molecular Biology of Bacterial Viruses. pp. 40 - 63. W. H. Freeman and Company, San Francisco, USA.

61. Swarup, S., R. De Feyter, R. H. Brlansky, and D. W. Gabriel. 1991. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of X. *campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. Phytopathology 81: 802 - 809.

62. Swarup, S., Y. Yang, M. T. Kingsley, and D. W. Gabriel. 1992. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. Mol. Plant - Microbe Interact. 5:204 - 213.

63. Timmer, L. W., T. R. Gottwald, and S. E. Zitko, 1991. Bacterial exudation from lesions of Asiatic canker and citrus bacterial spot. Plant Dis. 75: 192 – 195.

64. Tsai, Y. P. 1988. Citrus in Saudi Arabia: Present situation of citrus cultivation in Saudi Arabia. (in Chinese) Shinnung Farm Mag. (Taiwan, ROC) 238 (8): 84 – 89.

65. Tu, J., H. R. Wang, S. F. Chang, Y. C. Charng, R. Lurz, B. Dobrinski, and W. C. Wu. 1989. Transposable elements of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* originationg from indigenous plasmids. Mol. Gen. Genet. 217: 505 – 510.

66. Vauterin, L., P. Yang, B. Hoste, M. Vancanneyt, E. L. Civerolo, J. Swings, and K. Kersters. 1991. Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains by sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, fatty acid analysis, and DNA – DNA hybridization. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 535 – 542.

67. Verniere, C., O. Pruvost, E. L. Civerolo, O. Gambin, J. P. Jacquemoudcollet, and J. Luisetti. 1993. Evalution of the biolog substrate utilization system to identify and assess metabolic variation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Appl. Environ. Microbiol. 59: 243 – 249.

68. Wakimoto, S. 1967. Some charatcteristics of citrus canker bacteria, *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson, and related phages isolated from Japan. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 33: 301 – 310.

69. Wu, W. C. 1960. Studies on the colonial variants of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. Plant Prot. Bull. (Taiwan, ROC) 2: 127 – 136.

70. Wu, W. C. 1972. Phage – induced alterations of cell disposition, phage adsorption and sensitivity, and virulence in *Xanthomonas citri*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 38: 333 – 341.

71. Wu, W. C. 1988. Citrus canker in Taiwan. pp.15 – 25. In: Proceedings of International Symposium of Citrus Canker, Decline / Blight, and Similar Diseases. (Rosetti, V., coor – dinated.) Fundacao Cargill. Campinas, Sao Paulo, Brazil.

72. Wu, W. C. 1988. Mutation induced by filamentous temperate phage Cf16 in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. (Abstr.) Genome 30 (Suppl. 1): 423.

73. Wu, W. C. 1989. Present situation of citrus canker. (in Chinese with English Summary) pp. 200 – 211. In: Proceeding of a Symposium on the Research and Development of Citrus in Taiwan. (Tu, C. C. and C. H. Hsio, eds.) Taiwan Agriculture Research Insti – tute, Taichung, Taiwan, ROC.

74. Wu, W. C. 1989. Phage – induced changes in genetics characteristics and their effects on virulence and pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. A Final Techincal Report (FG – TA – 103 (TW – ARS – 8)) to the US Department of Agriculture. Wash – ington, D. C., USA. (unpublished)

75. Wu, W. C. 1991. Identification of the pathotypes of *Xant homonas campestris* pv. *citri* isolated in Taiwan. (in Chinese) A Report (80 – NE – 7.1 – Liannung – 79 (27) to the

ROC Council of Agriculture. Taipei, Taiwan, ROC. (unpublished)

76. Wu, W. C. 1991. Transduction of motility mediated with filamentous phages in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. (in Chinese with English abstract) Reports (NSC-79-0409-B005-39 and NSC-80-0409-B005-20) to the ROC National Science Councial. Taipei, Taiwan, ROC. (unpublished)

77. Wu, W. C. 1994. Inhibiton of citrus canker by phage CP115. (in Chinese) A Report (83-TEC-2.4-Liannung-27(12)) to the ROC Agricultrual Councial. Taipei, Taiwan, ROC. (unpublished)

78. Wu. W. C., and Y. Y. Tan. 1987. Phage-induced mutations of histidine and cysteine syntheses in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. pp. 584-593. In: Plant Pathogenic Bacteria (Proceedings of the 6th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Maryland, U S A., June 2-7, 1985). (E. L. Civerolo, A. Collmer, R. E. Davis, and A. G. Gillaspie, eds.) Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

79. Wu, W. C., and S. L. Wu. 1992. Control of citrus canker with agrochemicals. Plant Pathol. Bull. (Taiwan, ROC) 1: 37-42.

80. Wu, W. C., and F. H. Yang. 1994. Mutation of histidine synthesis induced by filamentous phage Cf16 in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Plant Pathol. Bull. (Taiwan, ROC) 3: 1-8.

81. Wu, W. C., C. S. Chang, and K. C. Chung. 1994. Phages CP115 and CP122 of the citrus canker bacterium. pp. 555. In: Abstract Book of 7th Intenational Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division, and 7th International Congress of Mycology Division. (Czechoslovark Society of Microbiology, ed.) Prague, Czech Republic, July 3-8, 1994.

82. Wu, W. C., C. S. Chang, and H. F. Kuo. 1992. Phages CP115 and CP122 of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. (in Chinese; abstr.) Plant Pathol. Bull. (Taiwan, ROC) 1: 212-213.

83. Wu, W. C., N. M. Hung, and L. Y. Wang. 1990. Characterization of the phage-infected *Xanthomonas campestris* pv. *citri* mutants. Plant Prot. Bull. (Taiwan, ROC) 32: 289-297.

84. Wu, W. C., L. Y. Wang, and K. C. Chung. 1991. A supplemental list of the *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains isolated in Taiwan. Plant Prot. Bull. (Taiwan, ROC) 33: 301-304.

85. Wu, W. C., B. C. Yang, and H. Dai. 1988. Biological characterization of filamentous temperate phage Cf116. Plant Prot. Bull. (Taiwan, ROC) 30: 360 -370.

86. Wu, W. C., S. T. Lee, H. F. Kuo, and L. Y. Wang. 1993. Use of phages for identifying the citrus canker bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in Taiwan. Plant Pathol. (London, England) 42: 389-395.

87. Wu, W. C., K. C. Tzeng, M. C. Lee, and H. F. Kuo. 1989. Occurrence and distribution

of citrus canker in Taiwan. (in Chinses with English abstract) Plant Prot. Bull. (Taiwan, ROC) 31: 139-150.

88. Wu, W. C., Y. R. Hong, C. M. Huang, Y. Y. Tan, C. 1. Lee, S. F. Chang, C. H. Wang, and M. L. Huang. 1985. Phage-induced mutations in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Plant Prot. Bull. (Taiwan, ROC) 27: 19-33.

89. Wu, W. C., S. H. Ju, S. J. Lee, H. I. Maa, M. L. Huang, B. C. Yang, H. F. Kuo, and Y. K. Hsueh. 1986. Variations in Xanthomonas campestris pv. citri. (in Chinese with English abstract) Plant Prot. Bull. (Taiwan, ROC) 28: 241-252.

90. Yang, M. K., and T. T. Kuo. 1984. A physical map of the filamentous bacteriophage Cf genome. J. Gen. Virol. 65: 1173-1181.

91. Yang, M. K., W. C. Su, and T. T. Kuo. 1991. Highly efficient transfection of *Xanthomonas campestris* by electroporation. Bot. Bull. Acad. Sinica (Taiwan, ROC) 32: 197-203.

92. Young, J. M., J. F. Bradbury, L. Gardan, R. I. Gvozdyak, D. E. Stead, Y. Takikawa, and A. K. Vidaver. 1991. Comment on the reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse 1915) Gabriel *et al.* 1989 and X. *phaseoli* (ex Smith 1897) Gabriel et al. 1989 : Indication of the need for minimal standards for the genus *Xanthomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 172-177.

誌　謝

本文所列出有關筆者及其共同研究者的資料，得自中央研究院、行政院國家科學委員會、行政院農業委員會、行政院經濟部商品檢驗局、台灣省政府農林廳、台灣省青果運銷合作社、美國農部、以及德國交換獎學金等經費補助完成的研究結果，僅此敬致謝忱。

Citrus Canker and Its Pathogenic Bacterium

Wen-chuan Wu[1], *An-hsiou Cheng*[2], *Yuh-ru Wang*[2], *and Chien-kuo Hu*[3]

Professor[1], Graduate students[2] and Research assistant[3]
Graduate Institute of Plant Pathology
National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan 402

Summary

Citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* has occurred widely in the world. *X. campestris* pv. *citri* is a short rod with a polar flagellum and harbors several plasmids and transposable elements. Pathogenicity gene *pthA* of this bacterium belonging to *pathotype* A, after conjugal transfer through the plasmid pSS10.35 of *Escherichia coli*, enables strains of *X. campestris* pv. *citri* pathotype E and several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on grapefruit leaves. Phages CP1 and CP122 of this bacterium have spherical heads each with a long tail,whereas CP2 and CP115 are polyhedrial cubics each with a short tail. Phages Cf and Cf16 are filamentous,containing circular, single-stranded DNA. The replicative form (RF) DNA of Cf is able to transfect *X.campestris* pv. *citri* XW47 by electroporation. Cf16, after infection, neolysogenizes its host by integra tion of its RF DNA into the host chromosome. Phages Cf16, as well as Cf29,Cf32, Cf99, Cf117, and Cf134, after lysogenization, induce several auxotrophic mutations of *X. campestris* pv. *citri* XW47; the latters also mediate transduction of mobility of the bacterium. Five pathotypes of *X. campestris* pv. *citri* have been distinguished: pathotype A occurs widely in the world and is most pathogenic on grapefruit, sweet oranges, and Mexican lime; pathotype B occurs in Agrentina, Paraguay, and Uruguay and is most pathogenic on lemon and Mexican lime; pathotype C occurs in Brazil and pathogenic on Mexican lime; pathotype D distributes in Mexico and pathogenic on the Mexican lime leaves; all of these produce corky and raised lesions; pathotype E occurs only in Florida, USA and produces lesions of flat,water-soaked, and surrounded chlorosis on grapefruit, trifoliate orange, and citrumelo. Symptoms produced between pathotypes A-D and E are so different that some plant pathologists have named the disease and the causal agent belonging to pathotype E as citrus bacterial spot and X. campestris pv. citrumelo, respectively. Although some degrees of pathological, biochemical, and molecular differences exist, the diseases on citrus caused by the 5 pathotypes of this bacterium have still called canker and, hence, the causal bacterium *X. campestris* pv. *citri*. This bacterium and citrus canker can be identified or detected by pathological inoculation, physiological and biochemical tests, phage,enzyme-linked immunofluorescence, monoclonal antibody, genomic fingerprinting, DNA-DNA hybridization, restriction-fragment length polymorphism, and polymerase chain reaction te chniques.

Key words: Citrus canker, Citrus bacterial spot, Phages, Plasmids, Transposable elements